



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on the mechanism of spermatocyte-specific gene activation by enhancer and long noncoding RNA during mouse spermatogenesis [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	佐藤, 優衣
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第13167号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70048
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Yui_Satoh_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 の 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士 (生命科学) 氏 名 佐 藤 優 衣

学 位 論 文 題 名

Studies on the mechanism of spermatocyte-specific gene activation by enhancer and long noncoding RNA during mouse spermatogenesis
(マウス精子形成におけるエンハンサーと long noncoding RNA による精母細胞特異的遺伝子活性化メカニズムに関する研究)

精原細胞から精子を産出するまでの過程である精子形成においては未解明な事象が多く残されているが、中でも減数分裂期ステージ特異的遺伝子の活性化機構は重要な課題である。こうしたステージ特異的な発現を示す遺伝子は精子形成の進行に重要な役割を担っている事が判明している一方で、その転写活性化メカニズムはあまり解析されてこなかった。本研究ではマウスの精母細胞特異的に発現する *Protease, serine (Prss)/Testis specific serine protease (Tessp)* 遺伝子クラスターをモデルとしてこの謎の解明を目指した。*Prss/Tessp* 遺伝子クラスターは精巣特異的セリンプロテアーゼをコードする 3 つのパラログ遺伝子からなり、機能的重要性も報告されているため、精母細胞における転写活性化の最適なモデル遺伝子座の 1 つである。

第一章

まずは転写活性化に関与する領域の候補として *Prss/Tessp* 遺伝子座における DNase I Hypersensitive site (DHS)の探索を行ない、8 つの DHS の存在を確認した。これらのうち *Prss42/Tessp-2* 遺伝子下流の HSVIII 近くの領域において、精巣特異的な転写産物の存在がトランスクリプトーム解析で示唆されたため、RT-PCR 解析を行なったところ、新規 lncRNA の発見に至り *lncRNA-HSVIII* と命名した。*in situ hybridization* などの結果から、*lncRNA-HSVIII* は *Prss/Tessp* 遺伝子の転写される精母細胞において核に局在していた。すでに *lncRNA-HSVIII* の転写領域が精母細胞において *Prss42/Tessp-2* プロモーターと結合している事が判明していたので、*Prss42/Tessp-2* 活性化に関与する可能性を検証した。*Prss42/Tessp-2* プロモーターで駆動する Luciferase 遺伝子の下流に *lncRNA-HSVIII* 転写領域を含む 5.8kb 配列(HSVIII5.8kb)をつないだコンストラクトを作成し、この遺伝子を内在で発現する Hepa1-6 細胞と P19TG1 細胞で転写活性を測定した。その結果、*Prss42/Tessp-2* プロモーター活性は上昇したが、このコンストラクトから *lncRNA-HSVIII* が転写されていない事も判明した。したがって、この *Prss42/Tessp-2* プロモーター活性の上昇は HSVIII5.8kb 中のエンハンサー活性によるものと考えられた。実際に、*lncRNA-HSVIII* 転写領域の上流と下流の配列がいずれもエンハンサー活性を持つ事が分かった。

第二章

トランスクリプトーム解析では、*Prss44/Tessp-4* の下流からも精巢特異的な転写産物の存在が示されていて、実際に RT-PCR を行なったところ、もう 1 つの新規 lncRNA を発見し、*Tesra* と名付けた。生化学的解析によると *Tesra* は精母細胞の核に局在することが明らかとなり、*Prss/Tessp* 遺伝子の転写活性化に寄与する可能性を検証した。その結果、Hepa1-6 細胞に *Tesra* を過剰発現させたところ *Prss42/Tessp-2* の発現量が有意に上昇し、レポーター解析でも *Tesra* の過剰発現が *Prss42/Tessp-2* プロモーター活性を有意に上昇させることがわかった。さらに Chromatin Isolation by RNA purification (ChIRP) assay により、*Tesra* 転写産物が精巢生殖細胞で *Prss42/Tessp-2* プロモーター領域に結合していることもわかった。したがって、*Tesra* は *Prss42/Tessp-2* プロモーターに結合してその活性を上昇させる事でこの遺伝子の転写活性化に寄与する事が判明した。最後に、*Tesra* が第一章で同定したエンハンサーと機能的に協働する可能性について、Tet-on system を用いて検討した。その結果、*Tesra* は *lncRNA-HSVIII* 下流エンハンサーと同時に存在する時に *Prss42/Tessp-2* プロモーター活性を加算的に上昇させることがわかった。つまり、下流エンハンサーと *Tesra* は *Prss42/Tessp-2* 遺伝子の転写活性化に対して、それぞれ独立でも機能できるが機能的に協働もする事が判明した。

本研究によりこれまで解析が進んでいなかった精母細胞特異的な遺伝子活性化機構と精子形成の減数分裂における lncRNA 機能の一端が明らかになった。また、*Tesra* と *lncRNA-HSVIII* 下流エンハンサーの関係性は、これまで知られていたエンハンサーと lncRNA の関係性とは異なる新規のものであった。以上の事から、本研究の成果は精子形成、転写調節、lncRNA 機能において新たな知見をもたらす大きな意義のあるものである。